尼罗罗非鱼染色体的C带、Ag带和减数分裂联会复合体的研究

王蕊芳　马昆　施立明　贺维顺
（中国科学院昆明动物研究所）

摘　要

以Sumner法和界面铺张——硝酸银技术，对尼罗罗非鱼（*Tilapia nilotica*）染色体C带、Ag染带及减数分裂前期精母细胞联会复合体（SC）进行了显微和亚显微结构观察。

尼罗罗非鱼的2n＝44，核型可分为三个组：第一组为4对亚中着丝粒染色体；第二组为17对亚端着丝粒染色体；第三组为具1对端着丝粒的特大染色体。

结构异染色质主要分布于着丝粒附近，其中Nos. 6、8、15亚中着丝粒染色体短臂全部深染。带有银染核仁组织者（Ag-NORs）染色体的数目为2—6条，NORs均位于6、8、15 亚中着丝粒染色体短臂。

银染色可清楚地显示尼罗罗非鱼的联会复合体（SC）结构和减数分裂行为。SC组型与有丝分裂染色体的组型有较好的一致性。

关键词：尼罗罗非鱼，染色体组型，核仁组织者，C—带，联会复合体

罗非鱼是原产非洲的一种热带鱼，属鲈形目（Perciformes）、鲡鱼科（Cichlidae）、罗非鱼属（*Tilapia*）。由于世代周期短，繁殖力强，染色体数目又不多，是鱼类遗传学研究较为理想的材料。有关罗非鱼的细胞遗传学研究，已有过常规组型的报道（陈敏容等，1983；Kornfield等，1979；Michele等，1977；Vervoort等，1980）。有关鱼类的SC研究为数不多，据查阅到的文献，仅见Foresti等（1983）对*Tilapia rendalli*以及马昆等（1987）对黄鳝SC的报道。*Tilapia*属除少数种类外，大多数的二倍体数均为44，核型组成也较为相似。本工作研究了尼罗罗非鱼的结构异染色质分布特征，银染核仁组织者数目和分布以及减数分裂联会复合体的结构及行为，以为深入了解其细胞遗传学特征提供新的资料。

材 料 和 方 法

实验用鱼来自昆明车家壁温流水养殖场。2♀、2♂，重量为200—300g。

1989年3月18日收到，同年9月15日修回。

采用常规血细胞培养方法。培养液的组分为8ml“1640”培养基+2ml小牛血清+0.4ml PHA。再加青霉素100IU/ml、链霉素100μg/ml。接种血样后置于29°C培养箱中培养98小时，在收取细胞前4小时，加入最终浓度为0.2μg/ml的秋水仙素，用0.4% KCl低渗30—40分钟，甲醇：冰醋酸（3：1）固定，Giemsa染色。观察后的染色体标本以固定液褪色，以Sumner法（1972）作C带染色，即室温下，用0.2*N*的HCl处理0.5—1小时，水洗干燥，将片龄2天左右标本浸入5%、60°C $Ba(OH)_2$溶液中2—3分钟，再用0.2*N*的HCl冲去载片上附着的$Ba(OH)_2$沉淀，蒸馏水冲洗后以10% Giemsa（磷酸盐缓冲液配制，pH=7.2—7.4）染色15分钟。镜检后仍以固定液褪色，蒸馏水冲洗干净，采用Howell和Black（1980）的快速银染法显示核仁组织者（NORs）。

联会复合体标本的制备和观察：取性成熟雄性尼罗罗非鱼的性腺剪碎，用0.5% KCl在室温下低渗15—20分钟，常规离心，弃上清液，采用界面铺张方法（Moses，1977）制备SC标本。按Howell等（1980）的方法进行硝酸银染色。在光镜下找到SC分散良好的细胞，将其移到单孔铜网上，用日立H-300电镜（电压75KV）观察。SC的测量方法参考Weng Kong Sung等（1982）的方法，以10个细胞的测量结果计算SC的平均相对长度，并与相应的有丝分裂染色体的相对长度作相关性的统计学分析。根据计算的结果绘制尼罗罗非鱼的SC及有丝分裂染色体组型图。

结果与讨论

经雌雄个体共150个（其中雄性60个、雌性90个）中期分裂相的观察、计数确定，2n=40—41的有9个，2n=42—43的有20个，2n=44有121个，占计数细胞总数的81%。因此，尼罗罗非鱼为2n=44。其核型组成雌雄个体相同，均为8sm（Nos. 6，8，15，21）+34t（Nos. 2，3，4，5，7，9，10，11，12，13，14，16，17，18，19，20，22）+2t（No. 1）（图版Ⅰ．C）。

有关罗非鱼属（*Tilapia*）的核型已有不少报道（Kornfield等，1979；Michele等，1977；Thompson，1981；Vervoort等，1980；陈敏容等，1983）。此属鱼类除少数种类外，大部分种类，特别是东半球罗非鱼属的染色体数均为44，都有1对特大染色体，15—17对近端着丝粒染色体和3—5对亚中着丝粒染色体，核型的差异很小。本文中尼罗罗非鱼的核型与陈敏容等（1983）报道的基本一致，唯一的区别是亚中着丝粒的位置：陈敏容等（1983）描述的尼罗罗非鱼核型中，认为Nos. 6，8，15，20是亚中着丝粒染色体，我们根据体细胞染色体及SC测量结果，认为Nos. 6，8，15，21应为亚中着丝粒染色体。这可能与染色体收缩程度或测量误差有关。

已知C带染色主要用于显示结构异染色质分布和数量。从50个细胞中C带染色的观察中可看出，其结构异染色质主要分布于着丝粒附近，其中Nos. 6，8，15亚中着丝粒染色体短臂全部被深染（图版Ⅰ．D），大约有50%左右的No. 1染色体具明显的异固缩现象，它不仅与同一染色体短臂常染色质有明显区别，而且亦不同于块状的着丝粒C带。此外，还可看到No. 1染色体其中一条，其长臂距着丝粒的远侧部分与近侧部分染色程度不一（图版Ⅰ．A箭头所示）。这可能是C带变型（即多态现象），也可能与

罗非鱼属 No．1 染色体长度增加有关。这现象与 *Tilapia zillii* No．1 染色体C带相类似（Kornfield, 1979）。

在银染的细胞中，其核仁组织者银染阳性（Ag-NORs）染色体，在每个分裂相中出现的频率并不固定。变动范围为2—6条（表1），分布部位通常在亚中着丝粒染色体短臂（图版Ⅰ．E—Ⅰ）也正是C带染色显示的结构异染色质含量较为丰富的区域（图版Ⅰ．D、E）。

表1　尼罗罗非鱼染色体Ag-NORs数分布

Tab. 1. Ag-NORs distribution of *Tilapia nilotica*

观察NORs细胞数 Number of NORs observed	Ag-NORs数 Number of NORs 2	3	4	6
65	33	13	16	3
百分比（%）	50.77	20	24.62	4.61

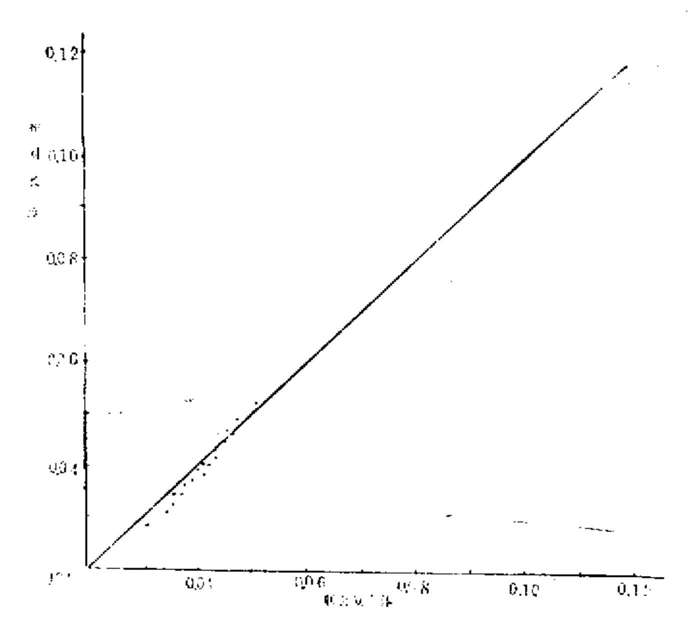


图1　SC与体细胞染色体相对长度相关图

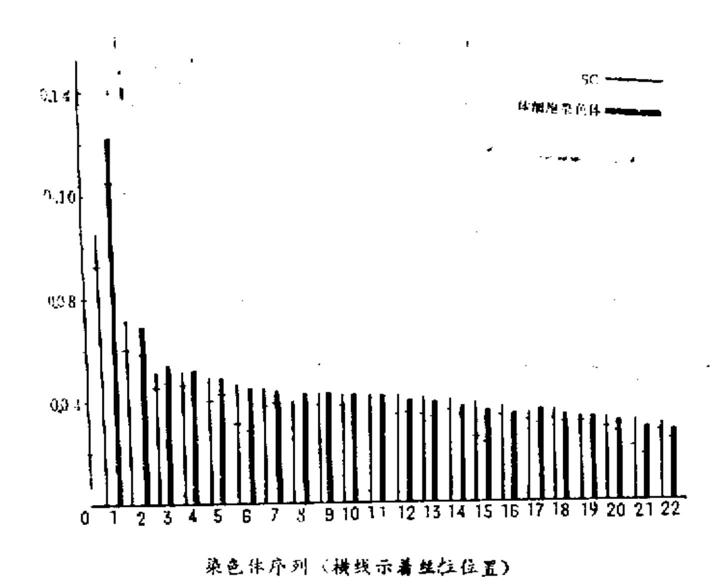
Fig. 1. Correlation diagram on relative length of SC with somatic chromosomes

在所观察的细胞中，NORs＝2或4所占的百分率较高，NORs＝3或6百分比较低。有的同源染色体对中，有时只有一条呈银染阳性，这可能是两个同源的NORs的活性不同，表现为银染区的大小或强弱的不同。这种NORs的多态现象，也见于裸背鳗目（Gymnotiformes）中几种鱼类（Foresti等，1981）。

已知减数分裂联会复合体的形成开始于偶线期，完成于粗线期。在电镜下，尼罗罗非鱼SC与其他动物相似，是由两股平行的侧线组成。由于采用界面铺张和硝酸银染色，

中轴未能显示。在SC的中部或端部可见一略为膨大、染色较深的区域，应为着丝粒区域（图版Ⅰ）。

从10个SC分散良好、形态完整的粗线期细胞的测量结果，计算各条SC的相对长度。结果表明，SC的的相对长度，除No.1染色体变化较大外，其他染色体均较为恒定，同有丝分裂染色体的相对长度有显著的相关性（相关系数 r = 0.984）（表2）。按SC及体细胞染色体相对长度的递减顺序及着丝粒指数，绘制尼罗罗非鱼的组型图（图2）。



染色体序列（横线示着丝粒位置）

图2 SC和体细胞染色体组型模式图

Fig. 2. The idiogram of somatic chromosomes and SC

表2 罗非鱼联会复合体和体细胞染色体相对长度的比较

Table 2. Comparison of relative length of SC with somatic chromosomes in *Tilapia nilotica*

	联会复合体 (SC)				体细胞染色体 (SM)			
No	MSC	SD	CV	CR	MS	SD	CV	CR
1	0.1056	0.0126	11.8914	0.1365	0.1446	0.0073	5.0370	0.1457
2	0.0719	0.0041	5.7099	0.1586	0.0685	0.0029	4.1713	0.2108
3	0.0521	0.0030	5.6784	0.1041	0.0526	0.0037	7.0612	0.1254
4	0.0486	0.0020	4.0300	0.1345	0.0492	0.0024	4.8839	0.1234
5	0.0474	0.0019	4.0355	0.1172	0.0476	0.0023	4.8347	0.1434
6	0.0464	0.0021	4.4893	0.3447	0.0459	0.0019	4.0507	0.4307
7	0.0448	0.0008	1.8251	0.1312	0.0447	0.0015	3.3289	0.1250
8	0.0440	0.0009	2.0826	0.3455	0.0435	0.0010	2.2193	0.3905
9	0.0436	0.0010	2.3328	0.1174	0.0427	0.0010	2.3134	0.1311

续表 2

	联会复合体 (SC)				体细胞染色体 (SM)			
No	MSC	SD	CV	CR	MS	SD	CV	CR
10	0.0429	0.0009	1.9898	0.1069	0.0418	0.0010	2.3445	0.1174
11	0.0422	0.0009	2.1127	0.1220	0.0408	0.0016	3.8125	0.1208
12	0.0415	0.0011	2.7391	0.1367	0.0398	0.0015	3.8256	0.1237
13	0.0409	0.0011	2.6842	0.1516	0.0391	0.0017	4.4426	0.1262
14	0.0404	0.0012	2.9154	0.1305	0.0381	0.0015	3.9300	0.1293
15	0.0395	0.0010	2.4554	0.3601	0.0371	0.0013	3.5376	0.3960
16	0.0390	0.0009	2.2718	0.1086	0.0361	0.0010	2.8670	0.1241
17	0.0381	0.0009	2.3070	0.1196	0.0353	0.0011	3.2092	0.1273
18	0.0371	0.0010	2.8012	0.1089	0.0342	0.0012	3.4510	0.1266
19	0.0361	0.0014	3.7966	0.1476	0.0375	0.0012	3.6937	0.1393
20	0.0348	0.0013	3.6151	0.1229	0.0316	0.0015	4.8525	0.1262
21	0.0326	0.0020	6.0985	0.3483	0.0290	0.0020	6.9037	0.3938
22	0.0307	0.0026	8.5326	0.1133	0.0252	0.0042	16.4996	0.1558

Relative length = absolute length/Σabsolute length

MSC: mean length of SC

MS: mean length of somatic chromosomes

CV = SD/M × 100%

CR: centromere index

Foresti (1983) 曾对*Tilapia rendalli*的Ag-NORs和SC作过报道。在粗线期细胞中，发现有一对双价体具NORs，没有性染色体的分化。我们的结果与之相似，在尼罗罗非鱼体细胞及生殖细胞中，均未发现性染色体分化。在减数分裂中，通常性染色体有同常染色体完全不同的特殊结构与行为。在减数分裂的特定阶段，如哺乳动物X染色体出现局部的自身配对，形成发夹状结构。在某些昆虫的减数分裂前期，X染色体自身折叠形成环状结构。此外，性染色体的银染特征或嗜银性也不同于常染色体（施立明，1986）。我们在尼罗罗非鱼SC的观察中，并未发现这类特征，那么决定罗非鱼性别机制是否为雌性异性配子即ZW/ZZ型？我们对雌性体细胞的观察，亦未发现有异形染色体。

有关鱼类减数分裂SC的研究刚开始，特别是对鱼类性别有关的SC形成、结构与行为特征，有待于今后进一步研究。

参考文献

陈敏容等 1983 三种罗非鱼染色体组型的比较研究。遗传学报 10(1):56—62。

施立明 1986 减数分裂染色体研究的新进展——联会复合体分析及其应用。生物科学动态 (5):5—11。

马昆等 1987 黄鳝减数分裂和联会复合体组型分析。动物学研究 8(2):159—163。

Foresti, F. *et al*. 1981 Polymorphic nature of nucleolus organizer regions in fishes. *Cytogenet. Cell Genet*. 31:137—144.

Foresti, F. *et al*. 1983 Silver-stained NOR and synaptonemal complex analysis during male meiosis of *Tilapia rendalli*. *The Journal of Heredity* 74:127—128.

Howell, W. and Black, D. 1980 Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: 1-step method. *Experientia* 36:1014—1015.

Kornfield, I. L. *et al*. 1979 Biochemical and cytological differentiation among Cichlid fishes of the sea of galilee. *Evolution* 33(1):1—14.

Michele, J. L. *et al*. 1977 Comparative cytology of *Tilapia rendalli* and *Geophagus brasiliensis* (Cichlidae Pisces). *Cytologia* 42:535—537.

Moses, M. J. 1977a.b. Synaptonemal complex karyotyping in spermatocytes of the Chinese hamster. I. Morphology of the autosomal complement in spread preparation. II. Morphology of the XY pair in spread preparations. *Chromosoma* 60:99—137.

Sumner, A. T. 1972 A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell Res.* 75:304—306.

Thompsen, K. W. 1981 Karyotypes of six species of African Cichlidae. *Experientia* 37:351—352.

Vervoort, A. 1980 The Karyotypes of seven species of *Tilapia* (Teleostei: Cichlidae). *Cytologia* 45:651—656.

Weng Kong Sung *et al*. 1982 A technique for light and electron microsopy of the synaptonemal complex of the mouse oocyte. *Can. J. Genet. Cytol.* 24(6):675—680.

STUDIES ON C–, AG–BANDING CHROMOSOMES AND MEIOTIC SYNAPTONEMAL COMPIEX OF *Tilapia nilotica*

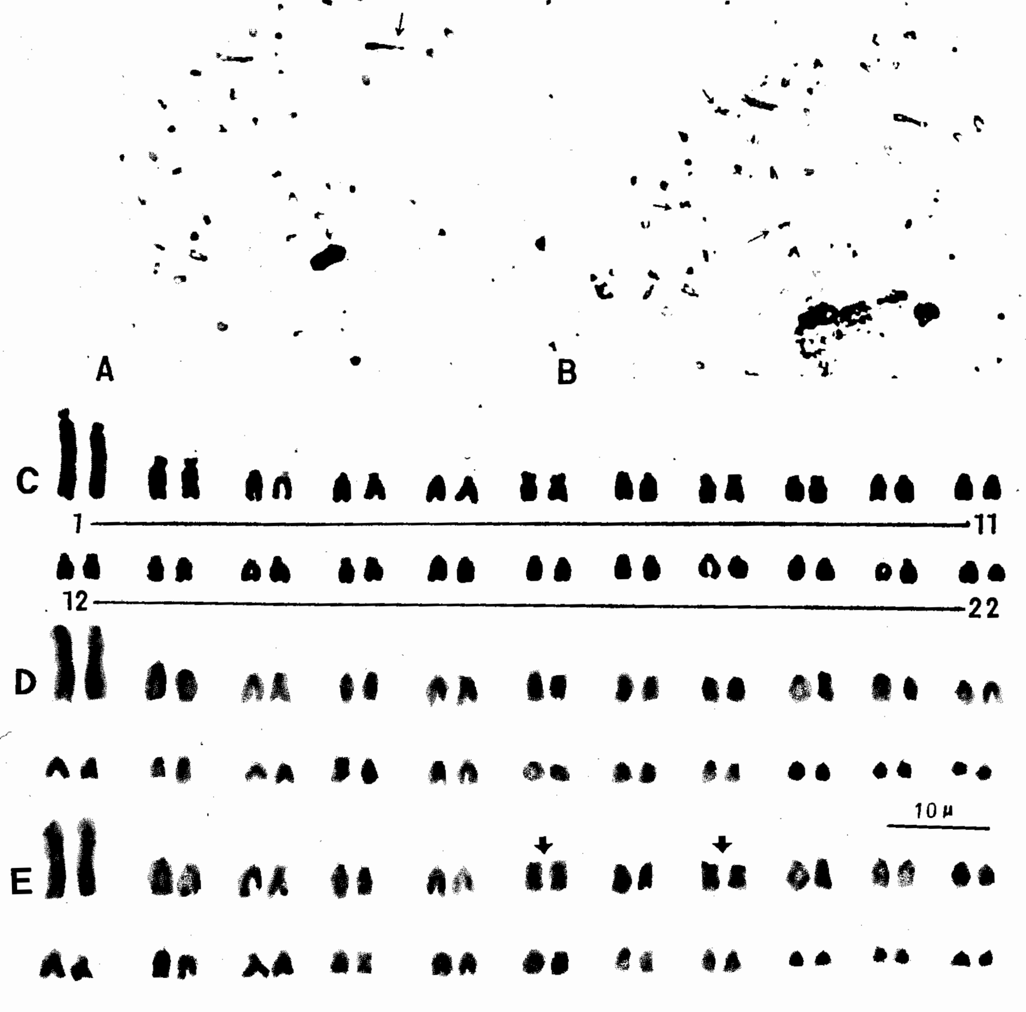
Wang Ruifang Ma Kun Shi Liming He Weishun

(*Kunming Institute of Zoology, Academia Sinica*)

C–, Ag–banding chromosomes and synaptonmal complex (SC) of *Tilapia nilotica* have been reported. The conventional karyotype of *Tilapia nilotica* consists of 22 pairs of chromosomes and can be classified into three groups; 4 pairs are submetacentric (Nos. 6, 8, 15, 21); 17 pairs subtelocentric (Nos. 2, 3, 4, 5, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 18, 19, 20, 22) and a pair telocentric (No. 1). The C–bands located mainly at the centromeric regions and Nos. 6, 8, 15 chromosomes have been darkly stained on the short arm. Two to six NORs are distributed on the short arm of submetacentric (Nos. 6, 8, 15). Twenty–two SC are formed during the pacytene stage and no heteromorphic chromosomes have been found. The SC karyotype of *Tilapia nilotica* also has been constructed.

Key words: *Tilapia nilotica*, Karyotype, Nucleolus organizer regions, C–banding pattern, Synaptonemal complex

图版 I



尼罗罗非鱼染色体C 带、Ag带中期分裂相和核型

The metaphase and Karyotypes on C-、Ag-banding of *Tilapia nilotica*

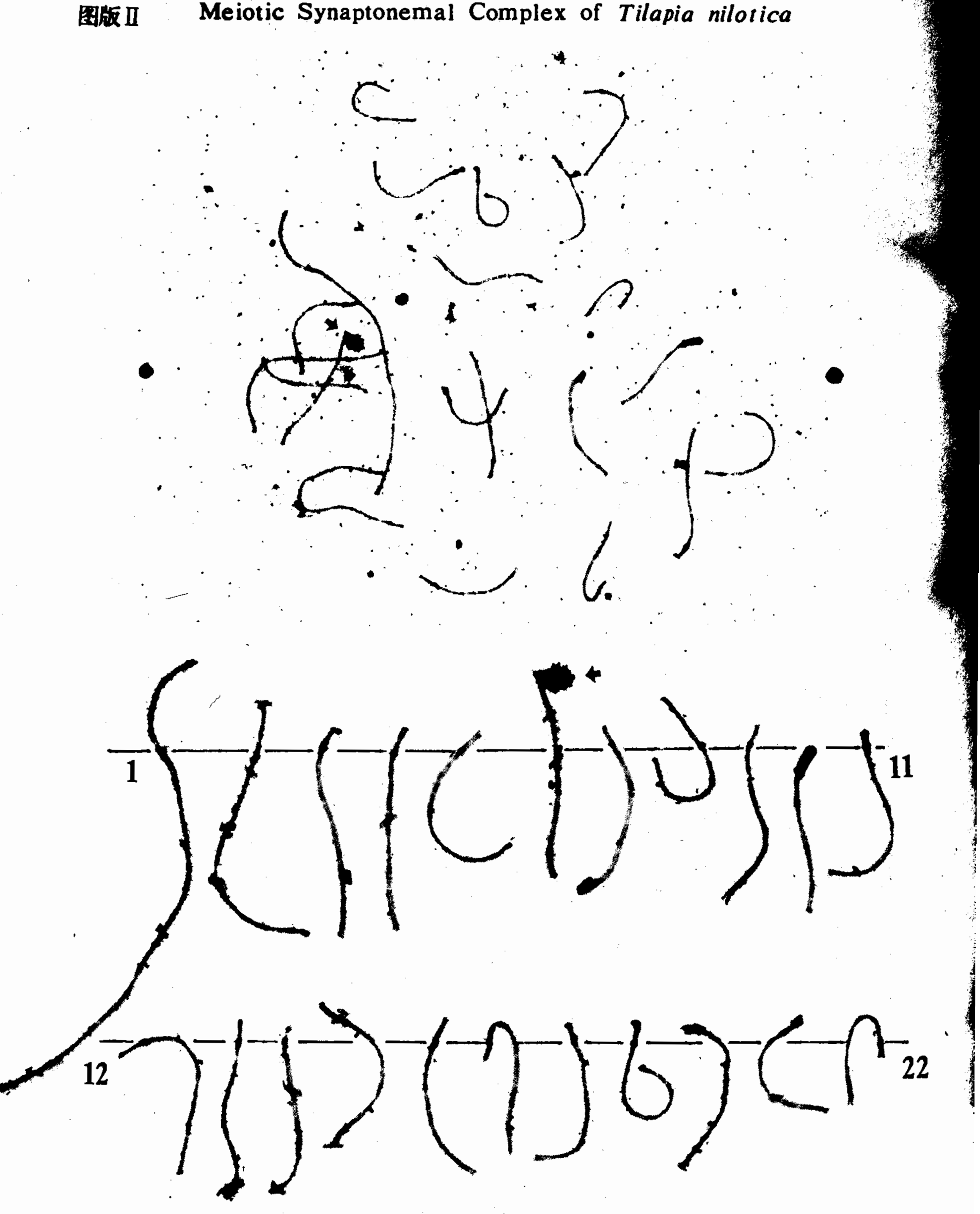
(Arrows showing Ag-NORs)

F G H I

各种细胞中不同数目NORs

The various number of NORs in different cells (F-I. NORs = 2 - 6)

图版Ⅱ



尼罗罗非鱼粗线期SC（箭头示核仁）

Synaptonemal complex Karyotype of *Tilapia nilotica*

(Arrow showing nucleolus lines indicate kinetochores)